



#14
9/21/00

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 197 07 971.7

Anmeldetag: 27. Februar 1997

Anmelder/Inhaber: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den
Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr. R. Kurth,
Langen in Hessen/DE

Bezeichnung: Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und
ihre Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive
Zellen

IPC: C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Neue Deutsche Patentanmeldung

Anmelder: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr. R. Kurth

5 "Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen"

Unser Zeichen: 158-1

10 Retrovirale Vektoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in CD4-positive Zellen

Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (Zell-Targeting-Vektoren), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung zur Genübertragung in Zellen.

15 Der Ausdruck "retrovirale Vektoren" oder "retrovirale Transfervektoren" bezeichnet infektiöse aber vermehrungsunfähige Retroviren, die Gene in Form von retroviralen Expressionskonstrukten (auch Expressionsvektoren genannt) in Zellen einschleusen können. Die Genübertragung führt zur Integration des Expressionskonstrukts in das Genom der Zelle. Der retrovirale Gentransfer ist vorteilhaft, weil (i) in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in Zellen überführt wird, (ii)
20 das Gen im allgemeinen ohne Mutationen oder Umlagerungen transferiert wird und (iii) ein stabiler chromosomaler Einbau erfolgt.

Es ist bekannt, retrovirale Vektoren auf der Basis des amphotropen murinen Leukämievirus (MLV) zu benutzen, um bestimmte Gene in Säugerzellen, speziell auch humane Zellen, zu
25 überführen. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man zwei Komponenten.

Zum einen benötigt man eine Verpackungszelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des MLV durch Expression psi-negativer Konstrukte bereitstellt, so daß diese Gene nicht in ein Retrovirus verpackt werden können. Als "psi" wird das Verpackungssignal der Retroviren
30 bezeichnet, daß die effiziente Verpackung der Boten-RNA steuert. Zum anderen ist ein sogenanntes Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in den retroviralen Vektor und den Transfer durch das Retrovirus erlaubt und das eine kodierende und übersetzungsfähige Region des gewünschten Genprodukts enthält. Somit muß das Expressionskonstrukt das Verpackungssignal psi enthalten. Die in der unbehandelten Verpackungszelle befindlichen gag-,
35 pol- und env-Gene müssen psi-negativ sein, damit entsprechende Boten-RNA nicht in die Retroviruspartikel aufgenommen wird. Nach der Überführung des Expressionskonstrukts durch

Transfektion der entsprechenden Vektor-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses Konstrukt, nicht jedoch die psi-negativen gag-, pol- und env-Gene, so daß diese nicht in Zielzellen überführt werden.

5

Der Tropismus der retroviralen Vektoren, d. h. die Auswahl der Säugerzellen, in welche diese das Expressionkonstrukt überführen können, wird durch das env-Gen in der benutzten Verpackungszelle bestimmt. Das env-Gen wird in Hüllproteine übersetzt, welche die äußere Hülle des retroviralen Vektors bilden. Die env-Genprodukte des amphotropen MLV, das bisher vor
 10 allem für den Gentransfer benutzt wird, erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Speziell für den Gentransfer in humane Zellen erlaubt der amphotrope retrovirale Vektor nicht den selektiven Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger, weil das Empfängerprotein (Rezeptor) für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt amphotroper
 15 retroviraler Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen zu finden ist.

Im Rahmen der Gentherapie steht zur Zeit die stabile Übertragung unterschiedlicher Gene in Zellkultur, d. h. "ex vivo", im Vordergrund. Verbesserungen der retroviralen Vektoren wurden bisher erreicht, indem statt des retroviralen env-Gens des MLV die env-Gene anderer Retroviren
 20 in die Verpackungszelle eingebracht wurden. Beispielsweise wurden statt des MLV env-Gens die env-Gene des G-Proteins des "vesicular stomatitis virus (VSV)" (Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.-K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8033-8037) benutzt. Die resultierenden retroviralen Vektoren zeigten unter anderem eine erhöhte Stabilität.

Auch der mögliche Einsatz der env-Gene des "simian sarcoma associated virus" (Takeuchi, Y.,
 25 Simpson, G., Vile, R. G., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1992) *Virology* 186, 792-794), des "feline leukemia virus, subgroup B" (Porter, C. D., Collins, M. K., Taylor, C. S., Parkar, M. H., Cosset, F. L., Weiss, R. A. & Takeuchi, Y. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 913-919), des "feline endogenous virus RD114" (Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436) und des "human T zell leukemia virus I (HTLV-I)" (Vile, R.
 30 G., Schulz, T. F., Danos, O. F., Collins, M. K. & Weiss, R. A. (1991) *Virology* 180, 420-424) deutete sich in bestimmten Experimenten an. Versuche retrovirale Vektoren herzustellen, welche das env-Gen der Lentiviren HIV-1, HIV-2, "simian immunodeficiency virus (SIV)" oder des "human spuma retrovirus (HSRV)" enthielten, waren bisher nicht erfolgreich. Derartige retrovirale Vektoren würden die Kernproteine, codiert von der gag-Region, des MLV und die

Hüllproteine, codiert von der env-Region, eines anderen Retrovirus, beispielsweise des HIV, enthalten. Für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen stehen bisher keine Vektoren zur Verfügung. Der vorliegenden Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, retrovirale Vektoren in Formen bereitzustellen, die nicht den amphotropen Rezeptor der Säugerzellen sondern andere nur in bestimmten Geweben und Zelltypen exprimierte Rezeptoren anzusteuern. Diese Vektoren sind für eine spezifische Genübertragung in ausgewählte Zelltypen geeignet. Eine weitere Aufgabe ist es, ein Verfahren zur Herstellung solcher retroviralen Vektoren zu entwickeln.

- 10 Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung retroviraler Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß die Viruskern von murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwächeviren (HIV), Spumavirus (HSRV) oder Affen-
- 15 Immunschwächeviren (SIV) stammen, gelöst. Insbesondere sind die retroviralen Vektoren dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen vom menschlichen Immunschwächevirus 1 oder 2 (HIV-1, bzw. HIV-2) stammen. Besonders bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten. Insbesondere bevorzugt sind retrovirale Vektoren, deren Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder eines beliebigen Fragments des transmembranen
- 20 Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden sind.

Weiterhin werden Verpackungszellen bereitgestellt, in denen das psi-negative Hüllproteingen (env) der Lentiviren HIV oder SIV oder des HSRV und die psi-negativen gag/pol-Gene des MLV

25 exprimiert werden. Diese Verpackungszellen enthalten weiterhin psi-positive Expressionskonstrukte, welche mit Hilfe der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren übertragen werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung können Viruskern, die von einem definierten Retrovirus stammen, in Zusammenhang mit Expressionskonstrukten zur Herstellung der beschriebenen Zell-Targeting-Vektoren benutzt werden, die aufgrund ihrer Eigenschaften, hier aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals psi, in die Viruskern aufgenommen werden. Die Viruskern mit den zu übertragenden Expressionskonstrukten werden ummantelt von fremden Virushüllen, die von einem anderen Virustyp oder aus einer anderen Zelle stammen. Die

30

Expressionskonstrukte werden dann mit Hilfe der retroviralen Vektoren übertragen. Der Einbau der fremden Virushülle kann durch die Verwendung der verkürzten Form des transmembranen Hüllproteins des HIV-1 env-Gens pTr712 vermittelt werden. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Vollängen-Transmembranproteine oder durch Anhängen eines Anteils des Gens, welches zur Bildung der Viruskern führt, an die verkürzten oder an die Transmembranproteine, in die Vektoren aufgenommen werden. Besonders bevorzugt für solche Vektoren sind MLV abgeleitete Kapsidpartikel, welche die Hüllproteine anderer Retroviren, insbesondere anderer Lentiviren wie HIV oder SIV oder des humanen Spuma-Retrovirus (HSRV) enthalten. Diese Vektoren infizieren den gewünschten Zelltyp über den zellulären Rezeptor des Virus, von welchem die fremde Hülle abstammt.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wird eine beliebige Zelle mit einem psi-negativen Expressionsgen für gag- und pol-Gene transfiziert. Ferner kann die Zelle mit einem Expressionskonstrukt, umfassend ein psi-Verpackungssignal und die in eine Zielzelle zu überführende genetische Information, transfiziert werden. Die Zelle wird dann mit einem weiteren Expressionsgen, das die genetische Information für fremde Hüllproteine enthält, transfiziert. Die so hergestellte Zelllinie produziert retrovirale Vektoren, enthaltend die zu überführende genetische Information.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die MLV-env-negative Verpackungszelllinie TELCeB6 (Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436) mit dem verkürzten env-Gen pTr712 des Plasmids pLbAc/env-Tr712-neo (Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology* 189, 167-177; Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V. (1993) *Virology* 192, 605-617) transfiziert. Dabei entsteht eine Verpackungszelllinie, die die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren des Typs MLV (HIV-1) in den Zellkulturüberstand abgibt. Diese Vektoren enthalten Kapsidpartikel, die aufgrund der Expression des gag/pol-Gens des MLV in der Zelle entstehen, und Hüllproteine des HIV-1, welche durch die intrazelluläre Expression der verkürzten Fassung Tr712 des HIV env-Gens in die Vektorpartikel aufgenommen werden. Die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten das Vollängen-Oberflächenprotein gp120-SU des HIV-1 und die verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins, dessen kodierender Anteil aufgrund eines Stopkodons (Position 712) entsteht. Im einzelnen wurde nachgewiesen, daß dies zur Herstellung retroviraler Vektoren für den selektiven Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen führte. CD4-positive, nicht jedoch CD4-negative Zellen zweier ansonsten identischer Linien

konnten mit den Vektoren spezifisch transduziert werden, d. h. das Expressionskonstruktgen wurde überführt. Die Transduktion wurde in Gegenwart von Antikörpern gehemmt, welche die Infektion mit HIV ebenfalls hemmen. Das Oberflächenhüllprotein des HIV wurde auf der Oberfläche der hergestellten Gentransfervektoren nachgewiesen.

5

Die vorliegende Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene in bestimmte Zellen selektiv zu überführen,
- 10 - Gene in CD4-positive Säugerzellen selektiv zu überführen,
- weitere Effizienzsteigerungen des Gentransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte in vergleichbaren Verpackungszellen zu erreichen,
- Gentherapiestrategien zu entwickeln, für die ein selektiver Gentransfer in CD4-positive Säugerzellen notwendig oder hilfreich erscheint,
- 15 - insbesondere Gentherapiestrategien zur Behandlung oder Prophylaxe der HIV-Infektion des Menschen zu entwickeln, in dem HIV-hemmende Gene, z.B. Antisensegene, RNA-Ködergene oder transdominant-negative mutante Gene des HIV oder anderer Lentiviren in bestimmte Zellen überführt werden,
- insbesondere Gentherapiestrategien zur Einführung von Genen in bestimmte Zellen zu entwickeln, zur Behandlung oder Prophylaxe von Erbkrankheiten, wie z.B. der ADA-Defizienz
- 20 oder anderen genetisch behandelbaren Krankheiten, bei denen die Einführung in bestimmte Zellen vorteilhaft ist, und
- den Eintritt von Lentiviren in Säugerzellen im Detail zu untersuchen.
- 25 Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung.

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip der Übertragung von Genen mit Hilfe retroviraler Vektoren in Säugerzellen.

- 30 Abbildung 2 zeigt das Schema der Herstellung eines retroviralen Vektors (entnommen aus "Molecular Biotechnology", Principles and Applications of Recombinant DNA, B.R. Glick und J.J. Pasternak, ASM Press, Washington, D.C., 1994, Seite 411, und ins Deutsche übertragen).

Abbildung 3 zeigt schematisch einen allgemein anwendbaren Herstellungsweg für retrovirale

Vektoren (retroviraler Transfervektor) durch Transfektion einer zunächst Expressionskonstrukt-negativen Verpackungszelle mit einem Expressionskonstrukt, das aufgrund des Vorhandenseins des Verpackungssignals (hier: psi) das zu übertragende Gen (therapeutische Gensequenz) in die retroviralen Vektoren einschleust.

5

Abbildung 4 zeigt einen speziellen Herstellungsweg für retrovirale Vektoren des Typs MLV (HIV-1). Dargestellt sind das MLV gag/pol-Expressionsgen und das psi-positive Expressionskonstrukt pMFGInsLacZ, welche von der MLV env-negativen Verpackungszelle TELCeB6 exprimiert werden. Die env-Genvariante des HIV-1 (Tr712), welche die für das
 10 Vollängenoberflächen-Hüllprotein gp120-SU und die verkürzte Version des transmembranen Hüllproteins (Δ gp41-TM) kodierenden Regionen enthält, wird bei der Herstellung der MLV (HIV-1) Vektoren ebenfalls in dieser Zelle exprimiert.

Abbildung 5 zeigt den generellen Aufbau von viralen Vektoren, welche den Viruskern eines
 15 bestimmten Virus in Kombination mit der Virushülle eines anderen Virus enthalten am Beispiel der MLV (HIV-1) Vektoren.

Die Herstellung von MLV (HIV-1) Vektoren der Erfindung wird nachfolgend näher erläutert. Zunächst wird eine DNA hergestellt, welche die Bildung der notwendigen Proteine induziert, die
 20 zur Formierung von Viruskernen in der Lage sind. Die DNA wird in eine humane Wirtszelle transferiert und dort exprimiert. Die DNA enthält zusätzlich Operator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenzen erforderlich sind, welche die Bildung der Viruskern induziert. In die so gewonnene Wirtszelle wird eine zweite DNA übertragen, die zur Bildung von
 25 Hüllproteinen führen, die nicht von dem Virus stammen, von welchem die Viruskern stammen. Danach wird eine weitere DNA eingebracht, die von den Viruskernen verpackt wird und Sequenzen enthält, welche zur Bildung der gewünschten Proteine in der Zelle führen, in die mit Hilfe des retroviralen Vektors relevante Gene übertragen werden sollen.

Die DNA, welche zur Expression der Vektorhüllproteine führt, kann vorzugsweise vom env-Gen
 30 des HIV-1, HIV-2, des SIV, anderer HIV oder von HSRV stammen. Die verwendeten env-Gene können der Originalversion der genannten Viren entsprechen oder verkürzte Formen dieser env-Gene oder sogar modifizierte Formen dieser env-Gene sein. Das besonders bevorzugte HIV-1 env-Gen-pTr712 führt zur Bildung eines Vollängen-Oberflächenproteins gp120-SU und eines verkürzten Transmembranproteins. Das Transmembranprotein kann auch z. B. durch das

Anhängen der C-terminalen Domäne oder eines beliebigen anderen Fragments des Transmembranproteins des MLV oder eines anderen Virus modifiziert sein. Beispielsweise kann bei Verwendung von MLV Kapsidpartikeln der C-Terminus des Transmembranproteins des MLV anstelle des C-Terminus des HIV-1 env-Gens verwendet werden. Dabei kann die Spaltstelle des C-terminalen p2 Peptids modifiziert sein oder nicht.

Die genannten erfindungsgemäßen viralen Vektoren können zur Übertragung von Genen in bestimmte Zelltypen verwendet werden. Beispielsweise übertragen die erfindungsgemäßen MLV (HIV-1) Vektoren Gene speziell in CD4-positive Zellen. Diese Vektoren besitzen somit den Tropismus des HIV-1, dessen Hüllproteine sie enthalten. Bei der Verwendung anderer Hüllproteine können Gene in andere Zelltypen, beispielsweise in Blutstammzellen eingeschleust werden.

15

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

Zelllinien und Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* des Stammes DH10 α oder HB101 präpariert. Die molekulare Klonierung der Expressionskonstrukte pLBac/env-neo ist in Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V. (1993) *Virology* 192, 605-617 und pLssAc/env-Tr712-neo ist in Kräusslich, H.-G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.-M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H. R., Bosch, V. (1993) *Virology* 192, 605-617 und Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology*. 189, 167-177 offenbart. Diese Expressionskonstrukte kodieren die HIV-1 env-Gen Varianten und das Neomycin-Resistenzgen. Das Expressionskonstrukt pCRUCA, welches das env Gen des amphotropen MLV beinhaltet, wurde in Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) *Virology*. 189, 167-177 und Battini, J.-L., Heard, J.-M. & Danos, O. (1992) *J. Virol.* 66, 1468-1475 offenbart.

Die TELCeB6 Verpackungszelllinie, welche das retrovirale Expressionskonstrukt MFG-nlsLacZ sowie die Gene gag und pol des MLV exprimiert, wurde in Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. (1995) *J. Virol.* 69, 7430-7436 offenbart. Die HeLa-CD4⁺ Zellen wurden über das MRC AIDS Programm Reagents Project bezogen, die 293-Zellen wurden von ATCC (ATCC CRL 1573) bezogen. Alle adhären Zellen wurden in Dulbeccos Modified

Eagles Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum gehalten. Die humane T-Zelllinie Molt 4 wurde in RPMI-1640-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (GIBCO/BRL, D-Eggenstein) propagiert. Die Transfektion der Verpackungszelllinie TELCeB6 mit dem Expressionskonstrukt pTr712 wurde mittels Lipofektamin (GIBCO/BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Transfektion des Plasmids pREP4 (Invitrogen, Leek, Niederland) wurde die Hygromycin-Selektion in Gegenwart von 200 mg /ml Hygromycin B (Sigman, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Einer der daraus hervorgegangenen Klone stellt die Zelllinie TELCeB6/pTr712-K14 dar.

Virale Infektion, Bestimmung von Titern und Neutralisationsexperimente

Die adhärenenten Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Vertiefung oder in 6-Well-Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesäht. Die Molt 4 Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Dichte von 8×10^5 ausgesäht. Vor der Infektion wurden die Zellen über Nacht in Zellmedium inkubiert. Zur Infektionen wurden die Zielzellen für drei Stunden mit 1 ml verdünnten oder unverdünnten Retroviruspartikel-enthaltenden Überständen koinkubiert. Die Virionen enthaltenden Überstände wurden vorher durch einen 0,45 mm-Filter passagiert, um die kontaminierenden Zellen zu entfernen. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zielzellen mittels x-Gal-Test auf β -Gal-Expression untersucht. Die viralen Titer wurden wie beschrieben bestimmt. Die Titer sind in Kolonie formenden Einheiten pro ml angegeben (*colony forming units*, cfu). Zur Neutralisation der pseudotypisierten Vektoren wurde Serum eines HIV-1 infizierten Spenders eingesetzt.

Immunanfärbung der Tranfektanden

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit eiskaltem Methanol inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde eine Stunde lang Blockierungspuffer (PBS/ 2 % BSA) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschliessend mit einer 1:1000 verdünnten anti-HIV-1 Serumlösung für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit Peroxidase-gekoppeltem Protein G (Bio-Rad, Krefeld, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden die antigenpräsentierenden Zellen durch Zugabe von Substratpuffer (H202 mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt.

Wester-Blot-Analyse

Die Herstellung der Zellysate und die Durchführung der Western-Blots wurden nach üblichen Verfahren hergestellt. Die Viruspartikel in den Überstaenden der Verpackungszellen wurden mit
5 Hilfe von Ultrazentrifugation (45 min bei 45.000 upm und 40°C) aufkonzentriert. Die Zentrifugate wurden in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse wurde unter der Verwendung eines Ziegenserums gegen HIV-1 gp120-SU und Peroxidase-gekoppeltem Protein G durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektionskit (Amersham, Braunschweig,
10 Deutschland) nachgewiesen.

Membranfusionseigenschaft des HIV-1 Hüllproteins

Eine subkonfluente Kultur der Verpackungszelllinie TELCeB6/pTr712-K14 wurde mit Jurkat-
15 Zellen ueberschichtet, für 48 h propagiert und anschließend photographiert.

Patentansprüche

- 5

1) Retrovirale Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß die Viruskerne vom murinen Leukämievirus (MLV) und die Virushüllen von menschlichen Immunschwäчевiren (HIV), Spumavirus (HSRV) oder Affen-Immunschwäчевiren (SIV) stammen.
- 10

2) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen vom menschlichen Immunschwäчевirus 1 oder 2 (HIV-1, bzw. hiv-2) stammen.
- 15

3) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten.
- 20

4) Retrovirale Vektoren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Virushüllen das Vollängen-Oberflächenprotein und eine verkürzte Form des transmembranen Hüllproteins enthalten, das durch den C-Terminus oder ein beliebiges Fragment des transmembranen Proteins des murinen Leukämievirus (MLV) oder eines anderen Retrovirus verlängert worden ist.
- 25

5) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bilden, umfassend das Transfizieren einer Verpackungszelle (gag-, pol- und Expressionskonstrukt-positiv), die vom MLV stammende Hüllproteine produziert oder nicht produziert (env-negativ), mit einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält (env-positiv).
- 30

6) Verfahren zur Herstellung von Verpackungszellen, die retrovirale Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bilden, umfassend das Transfizieren einer Zelle mit Expressionsgenen für gag und pol, und/oder einem Expressionskonstrukt, umfassend ein Verpackungssignal und die zu überführende genetische Information, und einem Expressionsgen, das die genetische Information für Hüllproteine enthält.
- 35

7) Verfahren nach Anspruch 5, wobei als MLV-env-negative Verpackungszelle die Zelllinie TELCeB6 verwendet wird.

- 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei als env-Expressionsgen pL β Ac/env-Tr712-neo verwendet wird.
- 9) Verpackungszellen, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8.
- 5 10) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Überführung von Genen in Zellen.
- 10 11) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Überführung von Genen in CD4-positive Zellen.
- 12) Verwendung der retroviralen Vektoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung von Vektoren für die gentechnische Modifizierung von Zellen oder eines Wirkstoffs im Rahmen der Gentherapie.

Zusammenfassung

Beschrieben ist die Herstellung und Verwendung neuer retroviraler Vektoren für zelltypspezifischen Gentransfer, insbesondere ein Herstellungsverfahren von retroviralen Vektoren, die Kapsidpartikel des murinen Leukämievirus (MLV) und Hüllproteine des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) enthalten. Diese Vektoren können für die Genübertragung in ausgewählte Zelltypen, speziell in CD4-positive Säugerzellen verwendet werden.

Gentherapie mit retroviralen Genträgern

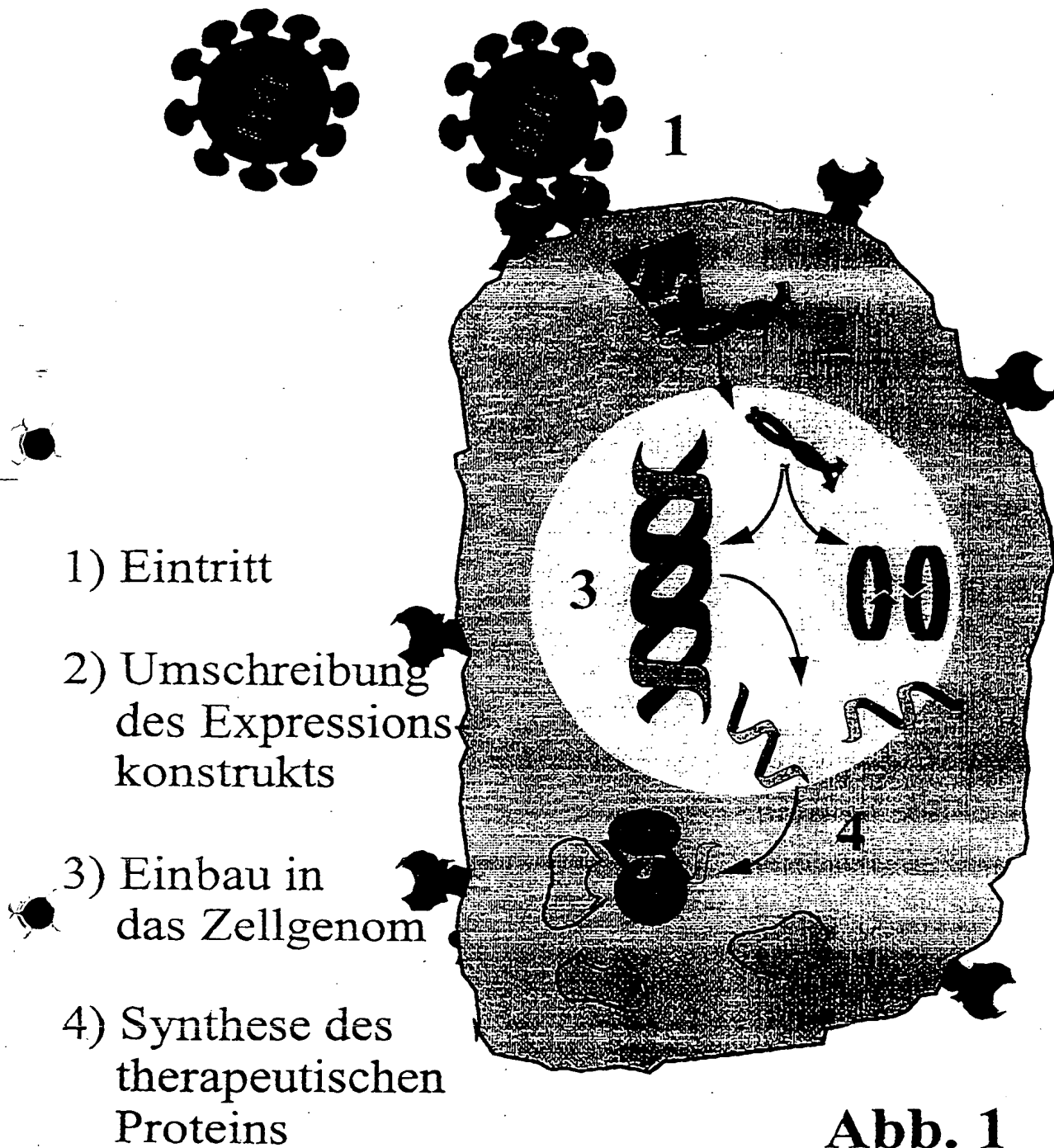


Abb. 1

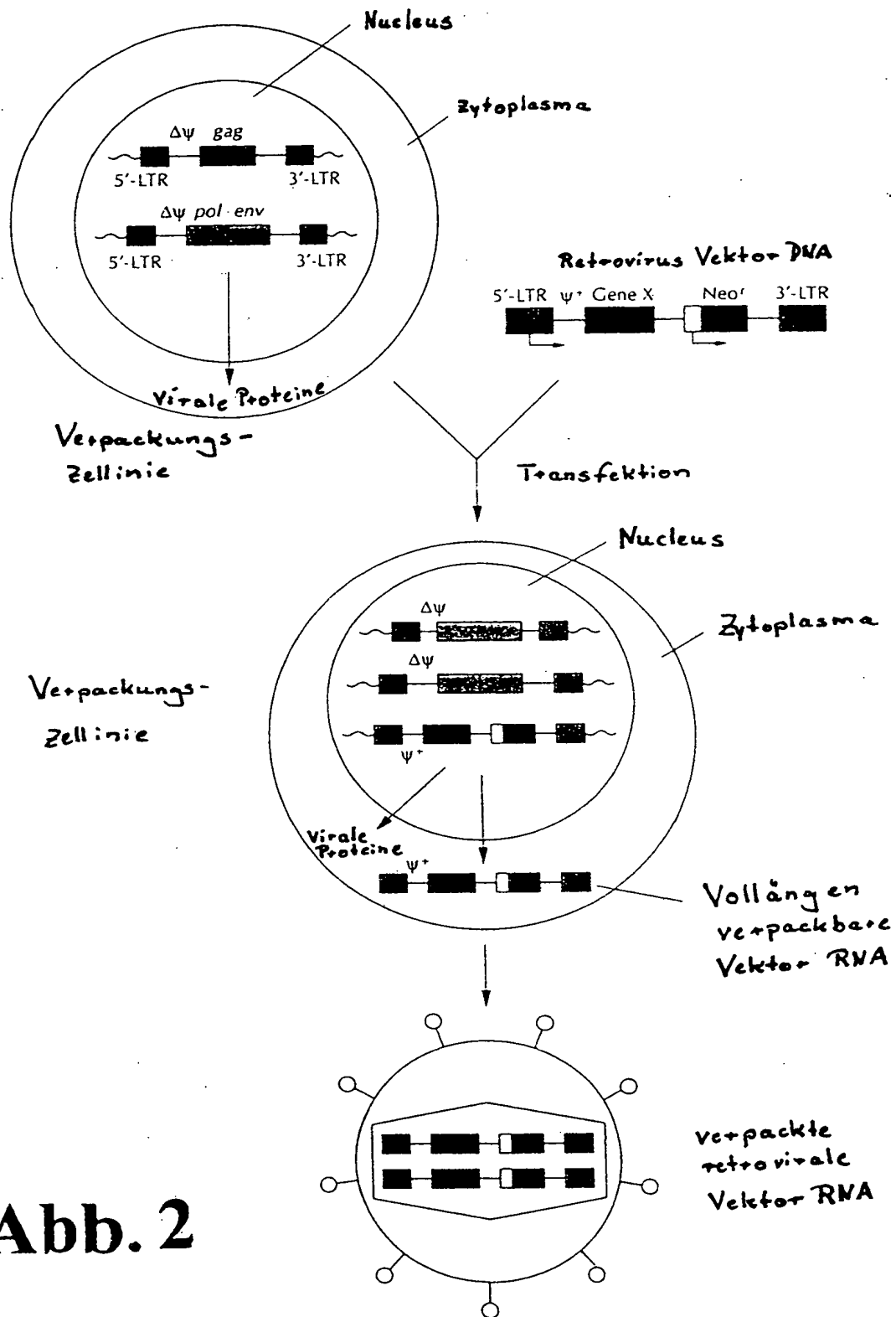


Abb. 2

Erzeugung retroviraler Vektoren

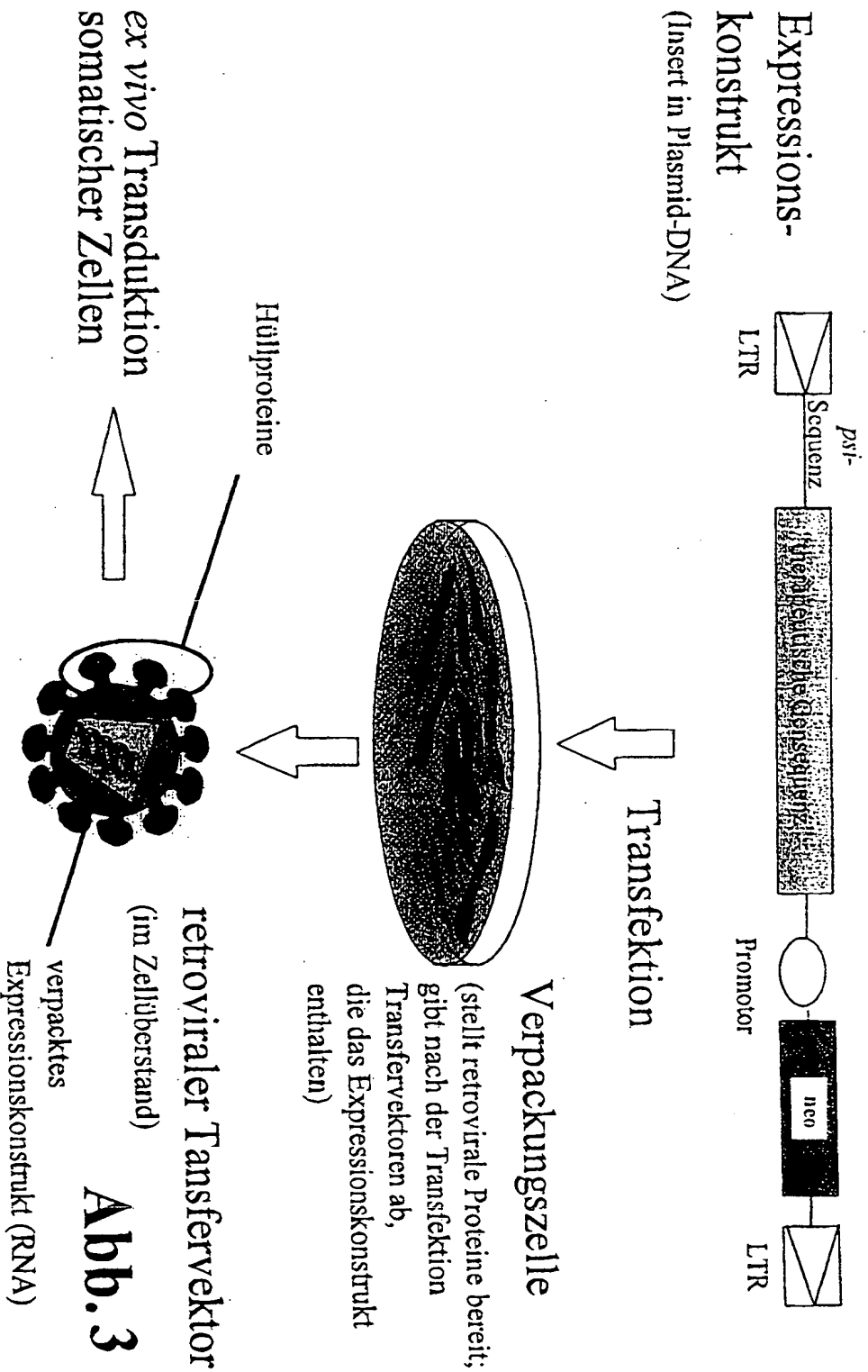
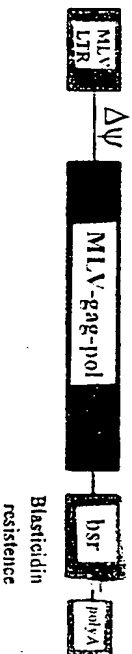


Abb. 3

Retrovirale Verpackungszelle

z. B. TE671 cells: human medulloblastoma

Expressionsgene für *gag* und *pol* des MLV,
die nicht verpackt werden



pMFGlnsLacZ

Expressionskonstrukt für *lacZ*,
das verpackt wird



env-Genvariante des HIV-1,
die ein verkürztes Transmembranprotein
exprimiert



Δ gp41-TM

Fusions- Membran-
peptid region

Stopkodon statt Aminosäure 712

Abb. 4

Aufbau retroviraler Vektoren mit Fremd-Hüllproteinen des HIV

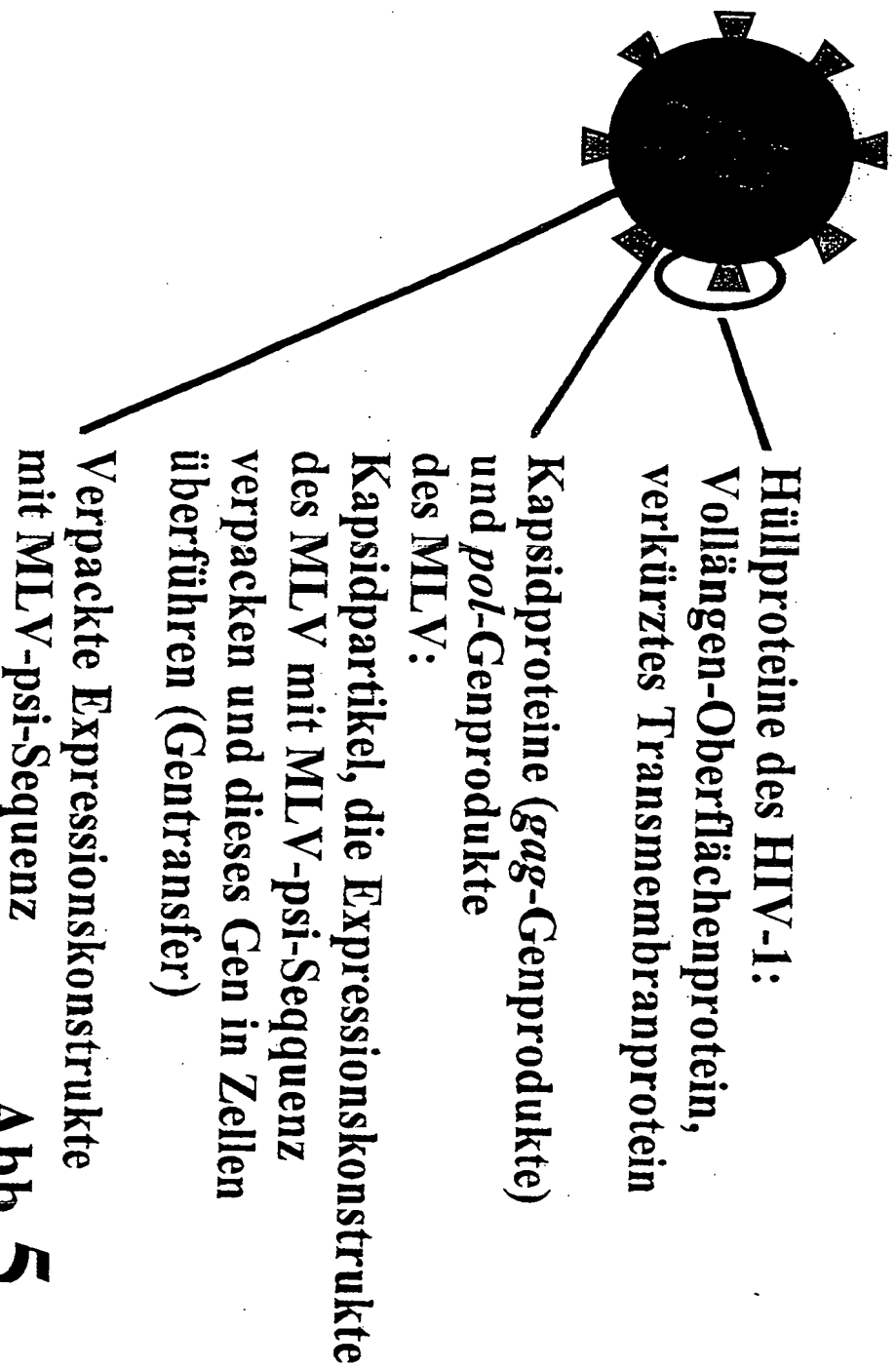


Abb. 5

Mail Room
Date 9/13/00
JH

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, *Dr. Sabine Riemann*,
of *Dr. Volker Vossius*
Patentanwaltskanzlei – Rechtsanwaltskanzlei
Holbeinstr. 5
D-81679 München
Germany

confirm that I am fully conversant with the German and English languages and I state that the following is a true translation of the best of my knowledge and belief.

- *German Patent Application 197 07 971.7, filed February 27, 1997 (priority document of PCT/DE98/00593)*

Applicant: *Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts*

Dated: August 24, 2000

Signature:

Sabine Riemann

Our Reference: 158-1US

Retroviral vectors, methods for their preparation and their use for gene transfer into CD4-positive cells

The present invention relates to retroviral vectors (cell targeting vectors), methods for their preparation and their use for the gene transfer into cells.

The term „retroviral vectors“ or „retroviral transfer vectors“ refers to infectious but replication incompetent retroviruses, which are able to transfer genes as retroviral expression constructs (also designated as „expression vectors“) into cells. The gene transfer results in the integration of the expression construct into the genome of the cell. Retroviral gene transfer is advantageous, because (i) usually one copy of the gene of interest is transferred into cells, (ii) the gene generally is transferred without any mutations or recombination and (iii) stable chromosomal integration occurs.

It is known to use retroviral vectors derived from the amphotropic murine leukemia virus (MLV) to transfer certain genes into mammalian cells, especially human cells. These vectors are replication incompetent and run only through one cycle of replication. For the preparation of such vectors two components are required. On the one hand, a packaging cell is required, that provides the *gag*-, *pol*- and *env*-gene products of MLV upon expression of psi-negative constructs so that these genes can not be packaged into a retrovirus. „psi“ designates the packaging signal of retroviruses, that mediates efficient packaging of messenger RNA. On the other hand, a so called expression construct has to be generated, that allows packaging into the retroviral vector and transfer by the retrovirus and that encompasses a coding and translatable region of the desired gene product. Thus, the expression construct has to contain the packaging signal „psi“. The genes *gag*-, *pol* and *env* within the untreated packaging cell must be psi-negative to prevent the respective messenger RNA from being packaged into retroviral particles. Upon transfer of the expression construct by transfection of the respective vector-DNA into the packaging cells, retroviral vector particles are released into the cell culture supernatant, that exclusively contain the expression construct, but not the psi-negative *gag*-, *pol* and *env* genes, which are thus not transferred into the target cells.

The tropism of retroviral vectors, i. e. the selection of mammalian cells into which these retroviral vectors can transfer the expression construct, is determined by the *env* gene in the respective packaging cell. The *env* gene is translated into envelope proteins, which form the

outer *envelope* of the retroviral vector particle. The *env* gene products of the amphotropic MLV, which is widely used for gene transfer, mediate gene transfer into a variety of different mammalian cells. However, in particular for gene transfer into human cells the amphotropic retroviral vector does not allow specific gene transfer into selected human or other mammalian tissues or cell species, as the acceptor protein (receptor) for the MLV-*envelope* proteins which mediates the uptake of amphotropic retroviral vector particles, and the gene transfer is found on the surface of almost all mammalian cells.

In gene therapy, today, stable transfer of different genes is mostly performed in cell culture, i. e. „ex vivo“. Retroviral vectors were improved by exchanging the retroviral *env* gene of MLV within the packaging cells by *env* genes derived from other viruses. As an example the *env* gene of MLV has been exchanged by the *env* gene encoding the protein G of „vesicular stomatitis virus (VSV)“ (Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8033-8037). The resulting retroviral vectors are characterized by enhanced stability. The possible use of the *env* genes of „simian sarcoma associated virus „ (Takeuchi et al., *Virology* 186 (1992), 792-794), of the „feline leukemia virus subgroup B“ (Porter et al., *Hum. Gene Ther.* 7 (1996), 913-919), of the „feline endogenous virus RD114“ (Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436) and of the „human T-cell leukemia virus I (HTLV-I)“ (Vile et al., *Virology* 180 (1991), 420-424) is suggested in certain experiments. Attempts to prepare retroviral vectors containing the *env* genes of the lentiviruses HIV-1, HIV-2 or „simian immunodeficiency virus (SIV)“ or "human spuma retrovirus (HSRV)" have not been successful, yet. Such retroviral vectors would contain the capsid proteins encoded by the *gag* gene of MLV and the envelope proteins encoded by the *env* gene of other retroviruses like, for example, HIV.

Vectors for the specific gene transfer into CD4-positive mammalian cells do not exist, yet. One object of the present invention is to provide retroviral vectors that do not target the amphotropic receptor of mammalian cells, but receptors that are exclusively expressed in certain tissues or cell types. These vectors are suitable to mediate the specific gene transfer in selected cell types. It is a further object of the present invention to develop a method to prepare such retroviral vectors.

These objects are solved according to the present invention by providing retroviral vectors comprising the viral cores derived from murine leukemia virus (MLV) and the viral envelopes derived from human immunodeficiency viruses (HIV), spumavirus (HSRV) or simian

immunodeficiency viruses (SIV). In particular, these retroviral vectors are characterized by the use of viral envelopes derived from human immunodeficiency virus type 1 or type 2 (HIV-1 or HIV-2). Preferred are retroviral vectors bearing viral envelopes that contain the full-length surface envelope protein and a truncated form of the transmembrane envelope protein.

5 Particularly preferred are retroviral vectors bearing viral envelopes that contain the full-length surface envelope protein and a truncated form of the transmembrane envelope protein that is elongated by the C-terminus or any other fragment derived from the transmembrane protein of the murine leukemia virus (MLV) or another retrovirus.

10 Furthermore, packaging cells are provided that express the psi-negative envelope genes (*env*) of the lentiviruses HIV or SIV or HSRV and the psi-negative *gag/pol* genes of MLV. In addition, these packaging cells contain psi-positive expression constructs that are transferred by the retroviral vectors according to the present invention.

15 In one embodiment of this invention viral core particles that are derived from a certain retrovirus can, in connection with expression constructs, be employed for the preparation of cell-targeting vectors. These expression constructs, as they contain the packaging signal psi, are packaged into the core particles. The core particles containing the expression constructs to be transferred are enveloped by foreign envelopes derived from other virus species or from another cell. The
20 transfer of these expression constructs is then mediated by the retroviral vectors. The incorporation of the foreign virus envelope can be mediated by the employment of the truncated variant of the transmembrane envelope protein of HIV-1 *env* gene pTr712. In a further embodiment of the present invention full-length transmembrane proteins or transmembrane proteins modified by the fusion of a portion of the gene leading to formation of viral cores to the
25 truncated or full-length transmembrane proteins can be used. These modified envelope proteins can be incorporated in retroviral vectors. Especially preferred are vectors derived from MLV that contain the envelope proteins of other retroviruses, in particular of lentiviruses like HIV or SIV or HSRV. These vectors infect the desired cell type by the interaction with the cellular receptor of the virus from which the foreign envelope is derived from.

30 In another embodiment of the invention any cell is transfected with a psi-negative expression gene encompassing *gag/pol* genes. Furthermore, the cell can be transfected with a psi-positive expression construct encoding the genetic information intended to be transferred. In addition, this cell is then transfected with a further expression gene encoding foreign envelope proteins.

Cell lines constructed this way then generate retroviral vectors that contain the genetic information desired to be transferred.

In a preferred embodiment of the invention, the MLV-*env*-negative packaging cell line
 5 TELCeB6 (Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436) is transfected with the truncated variant
 of the *env* gene pTr712 of plasmid pL β Ac/*env*-Tr712-neo (Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-
 177; Kräusslich et al., *Virology* 192 (1993) 605-617). The resulting packaging cell line produces
 retroviral vectors of the type MLV(HIV-1), according to the invention, into the cell culture
 supernatant. These vectors contain core particles that are produced upon the expression of the
 10 *gag/pol* gene of MLV in this cell and envelope proteins derived from HIV-1 that are
 intracellularly expressed from the truncated variant of the HIV-1 *env* gene Tr712 and
 subsequently incorporated into the vector particles. The vectors of the invention contain the full-
 length surface envelope protein gp120-SU of HIV-1 and the truncated variant of the
 transmembrane envelope protein which results from a stop codon at position 712. It was shown
 15 in detail that this results in the generation of retroviral vectors for selective transfer of genes into
 CD4-positive mammalian cells. CD4-positive, but not CD4-negative cells derived from
 otherwise identical cell lines were selectively transduced by these vectors, i. e. the expression
 construct gene was transferred. The transduction was inhibited in the presence of antibodies that
 also inhibit infection by HIV. The surface envelope protein of HIV was detectable on the surface
 20 of the generated gene transfer vectors.

Thus, the present invention offers the following possibilities:

- to selectively transfer genes into certain cells
- 25 - to selectively transfer genes into CD4-positive mammalian cells
- to further optimize efficiency of gene transfer by improving the *env* gene constructs in
 comparable packaging cells,
- to develop gene therapy strategies which require or are improved by the selective gene
 transfer into CD4-positive cells ,
- 30 - to especially develop gene therapy strategies for the prevention or therapy of HIV-infection in
 humans by transferring HIV-inhibiting genes e.g. antisense genes, RNA-decoys,
 transdominant-negative mutant genes of HIV or other lentiviruses into certain cells,
- to especially develop gene therapy strategies to transfer genes into certain cells for the
 prevention and treatment of congenital genetic disorders like ADA-deficiency or other

genetically treatable diseases that would benefit from the specific gene transfer into certain cells, and

- to study the cellular entry of lentiviruses into mammalian cells in detail.

5 The figures illustrate the invention.

Figure 1 schematically shows the principle of retroviral vector mediated gene transfer into mammalian cells.

10 Figure 2 shows a scheme of the preparation of a retroviral vector (taken from: "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, B.R. Glick and J.J Pasternak, ASM Press, Washington, D.C., 1994, Page 411, translated into German).

Figure 3 shows schematically a general method for the preparation of retroviral vectors (retroviral transfer vector) by transfection of a expression construct-negative packaging cell line with an expression construct that is due to the presence of a packaging signal (here: psi) able to package a gene to be transferred (therapeutical gene) of interest into retroviral vectors.

Figure 4 shows a particular method for the preparation of retroviral vectors of the type MLV(HIV-1). The MLV *gag/pol* expression gene and the psi-positive expression construct pMFGlnsLacZ that are expressed in the *env*-negative packaging cell line TELCeB6 are shown. In addition, the *env* gene variant of HIV-1 (Tr712) encoding the full-length surface envelope protein gp120-SU and the truncated variant of the transmembrane envelope protein (Δ gp41-TM) are also expressed in this cell line to generate MLV(HIV-1) vectors.

25 Figure 5 shows the general assembly of viral vectors that consist of core particles from a certain virus in combination with viral envelopes derived from foreign viruses, here explained on the example of MLV(HIV-1) vectors.

30 The preparation of MLV(HIV-1) vectors is described in detail below.

First, a sequence is generated that allows the production of the necessary proteins that allow the assembly of the viral core particles. The DNA is transfected into a human host cell and expressed therein. This DNA contains additionally operator-elements that are needed to express the DNA-

sequence and induce formation of the viral core particles. The new host cell generated that way is then transfected with another DNA-sequence encoding the envelope proteins derived from a virus which is different to the virus from which the viral core particles derived from. Then a further DNA is transfected into these cells that is packaged by the core particles and that comprises sequences that result in production of the desired proteins in the cell into which relevant genes are to be transferred by the retroviral vector. The DNA that result in the expression of the viral envelope proteins can preferably be derived from the *env* gene of HIV-1 or HIV-2 or other HIV-strains or of SIV or of HSRV. The *env* genes employed can be equivalent to the original native version of the viruses named above or can be truncated or even further modified variants of the respective *env* genes. The especially preferred HIV-1 *env* gene pTr712 results in the generation of a full-length surface envelope protein gp120-SU and a truncated variant of the transmembrane protein. The transmembrane protein can be further modified e. g. by fusion of the C-terminal domain or any other fragment of the transmembrane protein derived from MLV or any other virus. For example using core particles derived from MLV one can substitute the C-terminus of the *env* gene of HIV-1 by the C-terminus derived from the transmembrane protein of MLV. In this case the proteolytic cleavage site of the C-terminal p2 peptide can be modified or not.

The mentioned viral vectors according to the invention can be used for the transfer of genes into particular cell types. For example, the MLV(HIV-1) vectors of the invention transfer genes selectively into CD4-positive cells. Thus, these vectors show the tropism of HIV-1, from which the envelope proteins were derived from. Using other envelope proteins, genes can be transferred into other cell types, for example blood stem cells.

The following not-limiting examples illustrate the invention.

Cell lines and plasmids

All plasmids used were prepared from transformed *E. coli* strains DH10 α or HB101. The molecular cloning of the expression constructs pL β Ac/*env*-neo is described by Kräuslich et al., *Virology* 192 (1993), 605-617 and pLssAc/*env*-Tr712-neo is described by Kräuslich et al., *Virology* 192 (1993), 605-617 and Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-177. These expression constructs encode the *env* gene variants of HIV-1 and the neomycin-resistance gene. The expression construct pCRUCA comprising the *env* gene of amphotropic MLV is described by

Wilk et al., *Virology* 189 (1992), 167-177 and Battini et al., *J. Virol.* 66 (1992), 1468-1475. The TELCeB6 packaging cell line expressing the expression construct pMFG-nls lacZ and the genes *gag* and *pol* of MLV is described by Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995), 7430-7436. The cell line HeLaCD4⁺ was provided by the MRC AIDS reagents depository and 293 cells were purchased from ATCC (ATCC CRL 1573). All adherent cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum. The human T-cell line Molt4 (ATCC CRL 1582) was kept in RPMI-1640-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein, Germany) supplemented with 10% FCS. The transfection of the packaging cell line TELCeB6 with the expression construct pTr712 was performed using Lipofectamin (GIBCO/BRL, Eggenstein, Germany) according to the manufacturer's instruction. After transfection of the plasmid pRep 4 (Invitrogen, Leek, Netherlands) hygromycin B-selection was performed in the presence of 200 mg/ml hygromycin B (Sigma, Deisenhofen, Germany). One cell clone generated by this protocol is the cell line TELCeB6/pTr712-K14.

Viral infections, determination of titers and neutralisation experiments

The adherent cells were seeded into 24-well plates at a density of 4×10^4 cells per well or in 6-well-plates at a density of 2×10^5 cells per well. Molt4 cells were seeded at a density of 8×10^5 cells per well in a 6-well plates. Prior to infection the cells were incubated over night in cell culture medium. Cells were infected by co-incubation with 1 ml diluted or undiluted retroviral particle containing supernatants for three hours. Virion containing supernatants were freed from contaminating cells by filtration through a 0.45 μ m filter. Two days post infection target cells were assayed for the expression of β -Gal by X-gal staining. The viral titers were determined as described. The titers are given in colony forming units per ml (cfu/ml). A serum from a HIV-1-infected donor was employed to neutralize the pseudotyped vectors.

Immuno-staining of transfected cells

Cells were washed with PBS and incubated with ice-cold methanol for 15 min. After repeated washing the cells were incubated with blocking buffer (PBS / 2% BSA) for one hour. After repeatedly washing with PBS cells were incubated with a 1:1000 diluted HIV-1 specific serum solution for one hour. After repeatedly washing, cells were incubated with peroxidase-conjugated protein G (Bio-Rad, Krefeld, Germany). Finally, antigen-presenting cells were stained by addition of substrate-buffer (H_2O_2 with 3-amino-9-ethylcarbazol, Sigma, Deisenhofen, Germany).

Western-Blot-analysis

The preparation of cell lysates and Western-Blotting was performed using standard protocols.

- 5 Virus particles present in the supernatants of packaging cells were concentrated by ultracentrifugation (45 min at 200,000 x g at 40°C). The resulting pellets were resolved in sample buffer and subjected to SDS-PAGE. A goat serum directed against HIV-1 gp120-SU and peroxidase conjugated protein G was used for Western-Blotting. Protein bands were visualized using the ECL-detection kit (Amersham, Braunschweig, Germany).

10

Membrane fusion capacity of the HIV-1 envelope protein

A subconfluent culture of the packaging cell line TELCeB6/pTr712-K14 was covered with Jurkat T-cells, expanded for 48 hours and photographed.

15

Claims

- 1) Retroviral vectors, whereby viral cores are derived from murine leukemia virus (MLV) and virus envelopes are derived from human immunodeficiency viruses (HIV), human spuma retrovirus (HSRV) or simian immunodeficiency viruses (SIV).
- 2) Retroviral vectors according to claim 1, whereby the viral envelopes are derived from the human immunodeficiency virus type 1 or type 2 (HIV-1 or HIV-2).
- 3) Retroviral vectors according to claim 1 or 2, whereby the viral envelopes comprise a full-length surface envelope protein and a truncated variant of the transmembrane envelope protein.
- 4) Retroviral vectors according to claim 1 or 2, whereby the viral envelopes comprise a full-length surface envelope protein and a truncated variant of the transmembrane envelope protein, which is elongated by the C-terminus or any other fragment of the transmembrane envelope protein of the murine leukemia virus (MLV) or of any other retrovirus.
- 5) Method for the preparation of packaging cells, which produce retroviral vectors according to any of claims 1 to 4, comprising the transfection of a packaging cell (*gag*-, *pol*- and expression construct-positive) that produces or does not produce *env*-negative MLV-derived envelope proteins with an expression-gene that comprises the genetic information for envelope proteins (*env*-positive).
- 6) Method for the preparation of packaging cells that produce retroviral vectors according to any of claims 1 to 4, comprising the transfection of a cell with the expression genes *gag* and *pol* and/or with an expression construct, comprising a packaging signal and the genetic information desired to be transferred and with an expression gene that contains the genetic information for envelope proteins.
- 7) Method according to claim 5, whereby the cell line TELCeB6 is used as a MLV *env*-negative cell line.

- 8) Method according to any one of claims 5 to 7, whereby pL β Ac/env-Tr712-neo is used as *env* expression gene.
- 9) Packaging cells, obtainable by the methods according to any one of claims 5 to 8.
- 10) Use of the retroviral vectors according to any one of claims 1 to 4 for the transfer of genes into cells.
- 11) Use of the retroviral vectors according to any one of claims 1 to 4 for the transfer of genes into CD4-positive cells.
- 12) Use of the retroviral vectors according to any one of claims 1 to 4 for the preparation of vectors for the genetic modification of cells or of an active agent for gene therapy.

Summary

Described is the generation and application of novel retroviral vectors for cell-specific gene transfer, especially a method for the generation of retroviral vectors that encompass viral cores
5 derived from the murine leukemia virus (MLV) and envelope proteins derived from human immunodeficiency virus (HIV). These vectors can be used for the gene transfer into selected cell types, especially into CD4-positive mammalian cells.

Gene therapy with retroviral vectors

Fig. 1

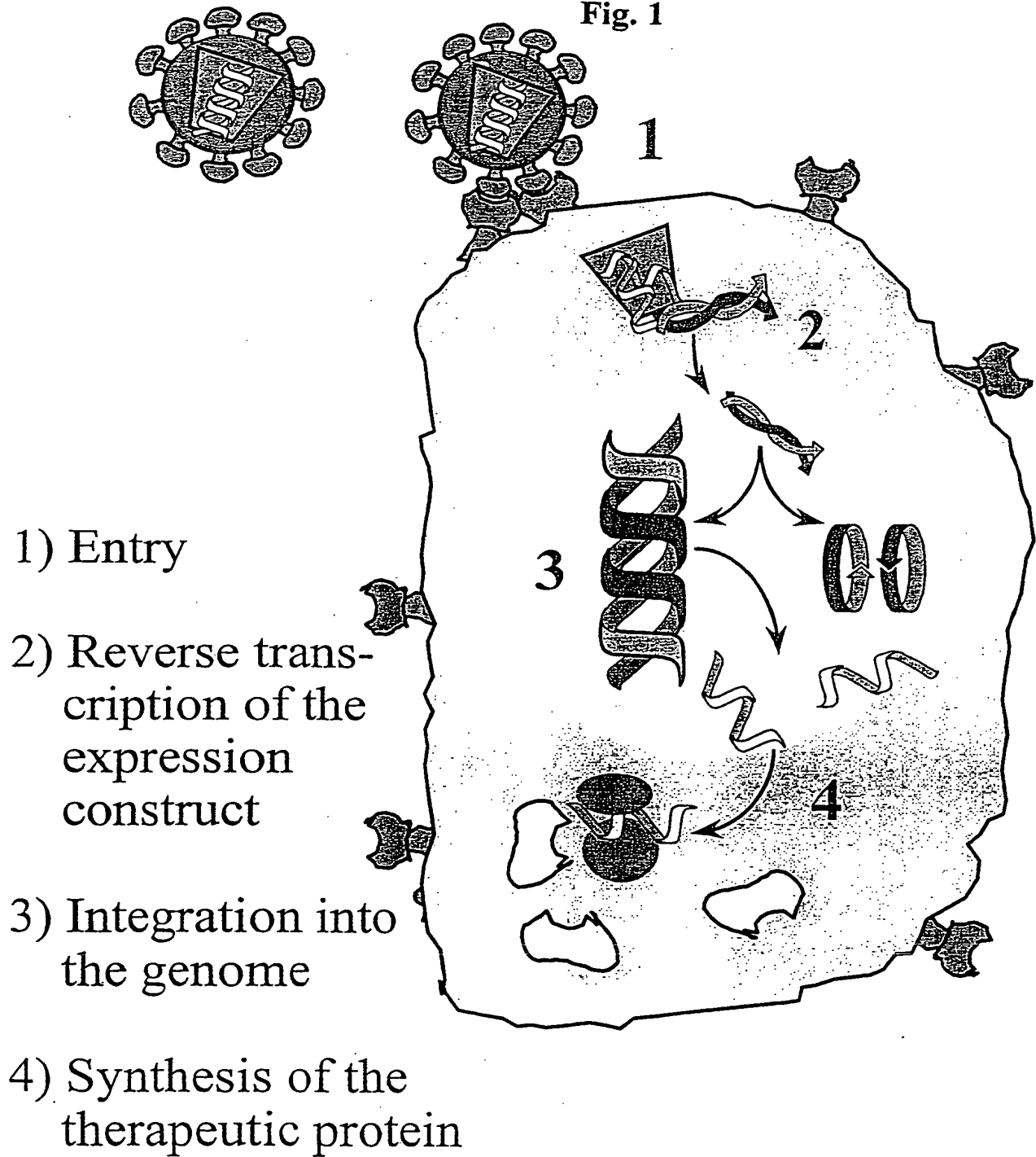


Fig. 2

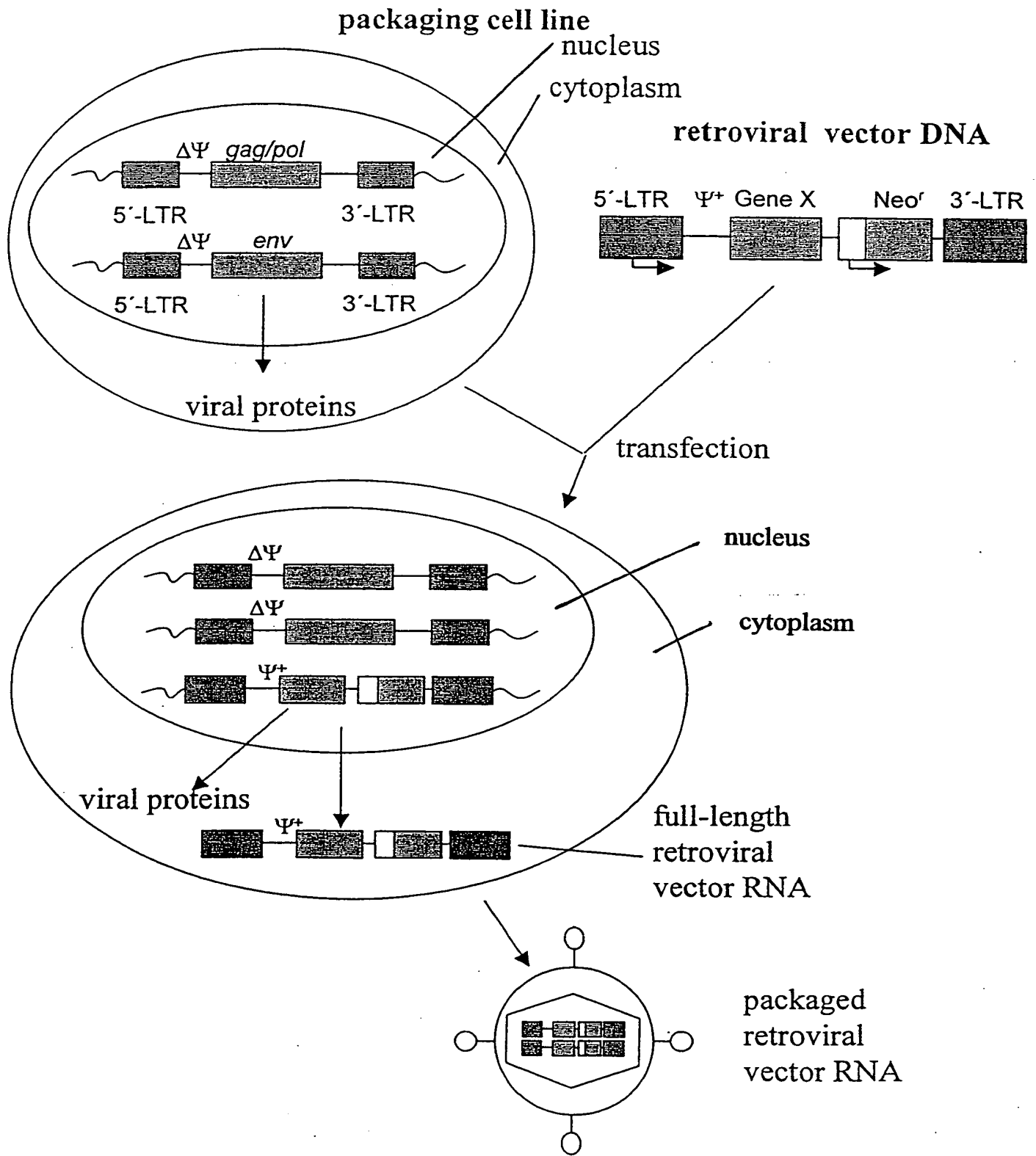
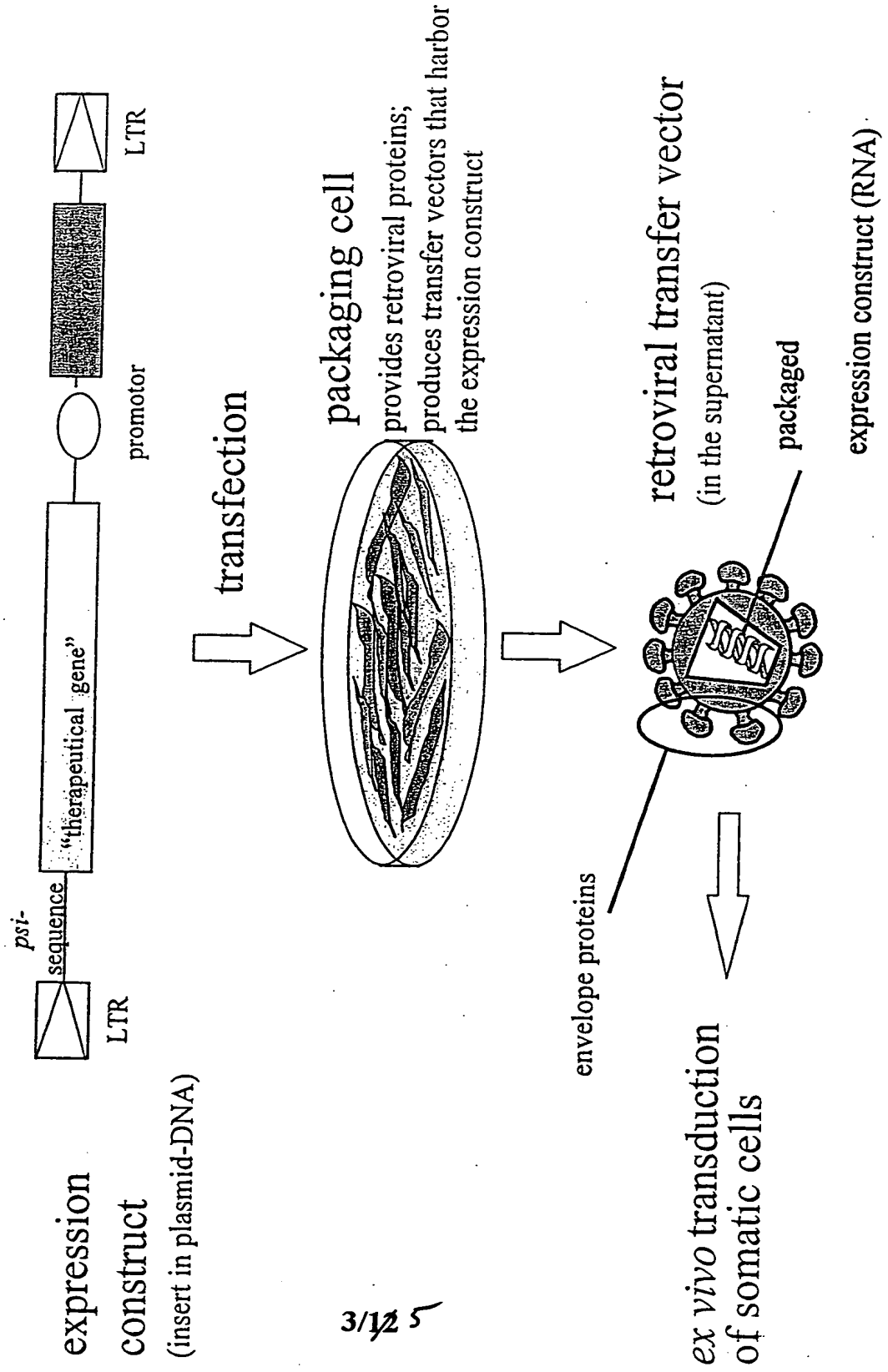


Fig. 3

Generation of retroviral vectors



3/12 5

Fig. 4

retroviral packaging cell

env gene variant of HIV-1 expressing a truncated transmembrane protein



e.g. TE671 cells: human medullablastom-cells

expression genes for *gag* and *pol* of MLV that are not packaged



pMFGInsLacZ expression construct for *lacZ* that is packaged



Δ gp41-TM

fusion-peptide membrane region (TMR)



stop codon instead of Aminosäure 712

Fig. 5 Assembly of retroviral vectors with foreign

envelope proteins of HIV

